

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH
Patent- und Lizenzabteilung,
Gebäude K 801
D-65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 28 January 2000 (28.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1998/L029 PCT	
International application No. PCT/EP99/02973	International filing date (day/month/year) 03 May 1999 (03.05.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND Brüningstrasse 50 D-65929 Frankfurt am Main Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. 069-305-5037	
	Facsimile No. 069-35-7175	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH Brüningstrasse 50 D-65929 Frankfurt am Main Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. 069-305-5037	
	Facsimile No. 069-35-7175	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Please also note the change of name in the address of correspondence.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
18 January 2000 (18.01.00)

International application No.
PCT/EP99/02973

Applicant's or agent's file reference
1998/L029 PCT

International filing date (day/month/year)
03 May 1999 (03.05.99)

Priority date (day/month/year)
15 May 1998 (15.05.98)

Applicant

BONGS, Jürgen et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

09 December 1999 (09.12.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under
Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

R. E. Stoffel

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 1/00, C12N 11/00, C12P 21/00, 19/00, 21/02, C07K 1/04, 14/62, C12N 11/02, 11/06		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/60150 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. November 1999 (25.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02973 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 1999 (03.05.99) (30) Prioritätsdaten: 198 21 866.4 15. Mai 1998 (15.05.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BONGS, Jürgen [DE/DE]; Hildastrasse 32, D-65189 Wiesbaden (DE). MEIWES, Johannes [DE/DE]; Theodor-Fliedner-Strasse 39, D-65510 Idstein (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD FOR CATALYSING COMPLEX REACTIONS OF LARGE MOLECULES USING ENZYMES WHICH ARE BONDED TO A POLYMER SUPPORT (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KATALYSE VON KOMPLEXEN REAKTIONEN GROSSER MOLEKÜLE MITTELS AN EINEM POLYMEREN TRÄGER GEBUNDENER ENZYME (57) Abstract <p>The invention relates to a method for catalysing complex reactions of large molecules, more specifically, to enzyme-catalysed reactions during which undesirable consecutive or subsidiary reactions usually occur; using enzymes which are bonded to a polymer support. According to the invention, undesirable consecutive or subsidiary reactions are to a large extent avoided by selecting a non-porous or almost non-porous support material. In particular, the invention relates to a method for the enzymatic extraction of biomolecules, preferably peptides, proteins, oligosaccharides or polysaccharides from their biologically inactive precursors using enzymes which are bonded to a polymer support, especially a method for extracting insulins or their analogs from the corresponding precursors using enzymes which are bonded to a polymer support. As a result of selecting a non-porous or almost non-porous support material, this method leads to a selective formation of biomolecules, especially of insulins or insulin analogs and corresponding valuable substances which can be split into said insulins or their analogs, undesirable consecutive or subsidiary reactions being to a large extent avoided.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich enzymkatalysierte Reaktionen, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, bei dem die unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen durch die Wahl eines porenfreien oder nahezu porenfreien Trägermaterials weitestgehend vermieden werden. Im besonderen betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, vorzugsweise von Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden oder Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, insbesondere ein Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, welches infolge der Wahl eines porenfreien oder nahezu porenfreien Trägers unter weitestgehender Vermeidung von Folge- oder Nebenreaktionen zu einer selektiven Bildung der Biomoleküle, insbesondere der Insuline bzw. der Insulinanaloga und der zugehörigen, zu Insulinen oder deren Analoga spaltbaren Wertstoffe, führt.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Beschreibung

Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich Reaktionen mit unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme und im besonderen ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen,

10 insbesondere von biologisch aktiven Peptiden, beispielsweise von Insulinen oder deren Analoga, von Proteinen, Oligosacchariden oder von Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen bzw. Vorläufern, beispielsweise Präproinsulinen, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme.

15 Die Herstellung von Humaninsulin und seiner Derivate ist über unterschiedliche Ansätze in der Literatur beschrieben. Neben der chemischen Synthese, die auf Grund der Komplexität des Zielmoleküls unwirtschaftlich ist, existieren weiterhin ein semisynthetisches sowie ein gentechnisches Verfahren.

20 Beim semisynthetischen Ansatz kommt es zu einem durch Trypsin katalysierten Austausch der C-terminalen Aminosäure der B-Kette des Schweineinsulins, der zur Bildung des Humaninsulins führt (H.-D. Jakubke et al., Angew. Chem., 97 (1985) 79).

25 Der gentechnische Ansatz zur Herstellung von Humaninsulin verläuft über die Stufe des Präproinsulins und seiner Derivate, die im Rahmen der Aufarbeitung ebenfalls einer tryptischen Spaltung unterzogen werden (B.H. Frank et al., Peptides: synthesis, structure, function, (1981) 729-738; Jonasson et al., Eur. J. Biochem., 236 2 (1996) 656-661; Kemmler et al., J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-
30 6791).

Zur effizienteren Nutzung des Enzyms wurde für den semisynthetischen Ansatz ein Verfahren entwickelt, das den Einsatz von immobilisiertem Trypsin erlaubt (EP 0 294 851).

- 5 Für die Gewinnung von Insulinen oder dessen Analoga aus den entsprechenden, gentechnisch hergestellten Präproinsulinen ist bislang kein enzymatisches Verfahren bekannt, bei welchem das Enzym Trypsin immobilisiert vorliegt, so daß bei bekannten Verfahren einerseits für jeden neuen Reaktionsansatz neues Trypsin zugegeben werden muß und andererseits im Rahmen der Produktaufreinigung eine
10 aufwendige Abreicherung des Enzyms notwendig ist.

Die tryptische Spaltung von Präproinsulin (PPI) ist eine komplexe, enzymkatalysierte Reaktion mit zahlreichen unerwünschten Folge- und Nebenreaktionen. Wie in Fig. 1 gezeigt, entstehen bei der tryptischen Spaltung von PPI auf Grund der zahlreichen
15 reaktiven Stellen eine Vielzahl von Reaktionsprodukten, von denen die Verbindungen Arg(B31),Arg(B32)-Insulin ("di-Arg") und Arg(B31)-Insulin ("mono-Arg") als die eigentlichen Wertsstoffe für die weitere Aufarbeitung anzusehen sind. Somit ist eine Abspaltung sowohl der Präsequenz als auch der "mittigen" (der im Präproinsulin zwischen der Sequenz der A-Kette und der Sequenz der B-Kette des
20 Insulins angeordneten) C-Kette notwendig. Kommt es an anderen Stellen des PPI's zu Spaltreaktionen, so entstehen unerwünschte Nebenprodukte wie z. B. das Des(B30)-Insulin ("des-Thr").

Während die Spaltung mit nativem Trypsin zur vorwiegenden Bildung der beiden
25 Wertstoffe führt, Arg(B31),Arg(B32)-Insulin ("di-Arg") und Arg(B31)-Insulin ("mono-Arg"), liefert der Einsatz von Trypsin-Immobilisaten auf der Grundlage konventioneller Träger wie z. B. Eupergit® C250L, Eupergit® C, Deloxan® ein unbefriedigendes Reaktionsmuster. Die beiden Wertstoffe di- und mono-Arg werden dabei in nur geringen Anteilen gebildet, während in erster Linie die unerwünschten
30 Folge- bzw. Nebenprodukte (vornehmlich des-Thr) entstehen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich enzymkatalysierte Reaktionen, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme bereitzustellen, bei dem die

5 unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen weitestgehend vermieden werden. Im besonderen ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen bereitzustellen, vorzugsweise von Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden oder Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme,

10 insbesondere ein Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme bereitzustellen, welches unter weitestgehender Vermeidung von Folge- oder Nebenreaktionen zu einer selektiven Bildung der Biomoleküle, insbesondere der Insuline bzw. der Insulinanaloga und der zugehörigen, zu Insulinen oder deren

15 Analoga spaltbaren Wertstoffe, führt.

Die Aufgabe wird gelöst durch Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener

20 Enzyme, das sich dadurch auszeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist, welche groß genug sind, daß die Enzyme innerhalb dieser Poren an den Träger binden können.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, ausgewählt aus der Gruppe der Peptide, Proteine,

25 Oligosaccharide oder Polysaccharide, aus deren Vorstufen mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist, welche groß genug sind, daß die Enzyme innerhalb dieser Poren an den

30 Träger binden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern, insbesondere den Präproinsulinen, mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme geeignet.

- 5 Insulinanaloga leiten sich von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin oder tierischen Insulinen, beispielsweise Schweine- oder Rinderinsulin, durch Substitution oder Fehlen wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines
- 10 Aminosäurerestes an A- und/oder B-Kette des natürlich vorkommenden Insulins ab.

Vorzugsweise ist das polymere Trägermaterial ein Copolymerisat aus den Monomeren Methacrylamid und N,N'-bis(methacrylamid), wobei das polymere Trägermaterial besonders bevorzugt über oxirangruppenhaltige Monomere verfügt.

- 15 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist das Enzym vorzugsweise mit Hilfe von Oxirangruppen kovalent an das Trägermaterial gebunden.

- Bei dem bevorzugten Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga
- 20 aus den entsprechenden Vorläufern, insbesondere den Präproinsulinen, wird als Enzym vorzugsweise Trypsin verwendet.

- Dabei weist das an dem Träger immobilisierte Enzym vorzugsweise eine Aktivität von 0,05 bis 0,5 U/ml auf, der pH-Wert der Reaktionslösung beträgt vorzugsweise 6
- 25 bis 10, besonders bevorzugt 7 bis 9.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung insbesondere anhand der Beispiele näher erläutert.

- 30 In einer Reihe von Immobilisierungen wurde Trypsin an unterschiedlichen Trägermaterialien kovalent gebunden (Eupergit® C, Eupergit® 250L, Deloxan®).

Der Einsatz dieser Immobilisate bei der Spaltung von Präproinsulin (PPI) lieferte jedoch trotz Variation verschiedener Reaktionsparameter wie z. B. pH-Wert, Temperatur oder Enzymkonzentration die gewünschten Wertstoffe di- bzw. mono-Arg in nur geringer Menge. Stattdessen bildeten sich überwiegend unerwünschte Nebenprodukte wie z.B. des-Thr.

Beim Einsatz von Trypsin, das auf dem Träger Eupergit® C1Z, einem porenfreien Träger, immobilisiert wurde, gelang überraschenderweise die PPI-Spaltung nach dem wie beim nativen Einsatz gewünschten Muster.

10

Die Wahl von einem porenfreien Träger, beispielsweise Eupergit® C1Z, bei der Immobilisierung von Trypsin erlaubt somit erstmalig den wiederholten Einsatz des Enzyms mit gleichzeitig sehr guter Selektivität bei der PPI-Spaltung zu Gunsten der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg. Eine dem semisynthetischen Verfahren analoge Verwendung des immobilisierten Trypsins mit der Konsequenz einer leichten Abtrennbarkeit des Katalysators von der Reaktionslösung sowie eines mehrfachen Einsatzes ist damit für das gentechnische Verfahren zur Herstellung von Humaninsulin möglich.

15

20 Beispiele

Beispiel 1 Immobilisierung von Proteinen auf polymeren Trägern

Beispiel 1.1 Deloxan®

25

Die Immobilisierung von Proteinen auf Deloxan® setzt eine vorherige Aktivierung des Trägers mit Glutardialdehyd voraus. Bei der eigentlichen Fixierung des Enzyms wurde in einer Meßreihe die aufgegebene native Aktivität des Trypsins variiert.

6

Aktivierung: pH = 9 [KPP: 100 mM]
 T = 25 °C
 t = 1 h
 Deloxan® = 10 g [VR = 150 ml]
 5 GD = 0,2 g/gTM

Fixierbedingungen: pH = 9 [KPP: 100 mM]
 T = 25 °C
 t = 3 h

10 Beispiel 1.2 Eupergit® C250L und Eupergit® C

Bei der Immobilisierung von Trypsin auf Eupergit®-Trägern wird in einer einstufigen Reaktion die Trägersuspension mit der Enzymlösung versetzt.

Fixierbedingungen für Eupergit® C250L:

15

pH = 8 [KPP: 1 M]
 T = 25 °C
 t = 3 d

20 Fixierbedingungen für Eupergit® C:

pH = 8,5 [Boratpuffer 100 mM]
 T = 25 °C
 t = 3 d
 25 Benzamidin = 24 mM

Beispiel 1.3 Eupergit® C1Z

Der Träger Eupergit® C1Z zeichnet sich im Gegensatz zu den übrigen Trägern durch Porenfreiheit aus.

5

Fixierbedingungen:

pH	=	8	[KPP: 1 M]
T	=	25	°C
t	=	3	d
nat. Trypsin	=	7.400 U/gTM	[Σ =37.000 U auf 5 g]

10

Unter den gegebenen Bedingungen wird eine spez. Aktivität von 405 U/gTM erzielt. Während die Fixierausbeute mit den Ergebnissen der beiden anderen Eupergit®-Träger vergleichbar ist, liegt die Wiederfindungsrate mit 46 % deutlich höher.

15

Beispiel 2

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Deloxan® fixierten Trypsins in einer Konzentration von 0,81 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt.

20

25

Wie in Fig. 2 zu sehen, entsteht über den betrachteten Zeitraum d s-Thr als Hauptprodukt, während die Menge der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg deutlich niedriger liegt.

5 Beispiel 3

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C250L fixierten Trypsins in einer
10 Konzentration von 1,62 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC
15 bestimmt.

Wie in Fig. 3 zu sehen, entsteht auch in diesem Fall über den betrachteten Zeitraum des-Thr als Hauptprodukt, während die Menge der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg, die darüberhinaus in einer Folgereaktion wieder abgebaut werden, deutlich
20 niedriger liegt.

Beispiel 4

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer
25 Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C1Z fixierten Trypsins in einer Konzentration von 0,081 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen
30 Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung

gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt.

Wie in Fig. 4 zu sehen, entstehen im Gegensatz zu den vorherigen

- 5 Umsetzungsversuchen mit immobilisiertem Trypsin auf der Grundlage dieses Trägers die beiden gewünschten Wertstoffe di- und mono-Arg im Überschuß, während der Anteil der Nebenprodukte (insbesondere des-Thr) drastisch herabgesetzt wird.

10 Beispiel 5

- In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C1Z fixierten Trypsins in einer
- 15 Konzentration von 0,405 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 12 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC
- 20 bestimmt. Auch in diesem Beispiel entsteht beim Einsatz des auf Eupergit® C1Z immobilisierten Trypsins das gewünschte Produkt- und Nebenprodukt-spektrum.

- Wie in Fig. 5 zu sehen, kann durch die Verfünffachung der Katalysatorkonzentration die Umsetzungsgeschwindigkeit erhöht und damit die benötigte Reaktionszeit
- 25 deutlich verkürzt werden, ohne daß sich dadurch die Selektivität der Reaktion zu Ungunsten der beiden Wertstoffe verschiebt.

Mögliche Deutung der Ergebnisse der Beispiele 2 bis 5

- 30 Beispielsweise im Falle von Präproinsulinen (PPI) handelt es sich bei dem Ausgangssubstrat im Gegensatz zu den Folgeprodukten der Reaktion um eine

größeres Molekül ($\cong 10$ kDa), das einer stärkeren Porendiffusionslimitierung unterliegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit aller Folgereaktionen ist aus diesem Grunde größer als die direkte Umsetzung von PPI in unterschiedliche Fragmente. Bei porenbehafteten Trägern sollte aus diesem Grunde eine Akkumulation des gewünschten Zwischenproduktes P (s. Fig. 6; in diesem Bsp.: di-Arg) nicht möglich sein. Als Lösungsansatz zur Steuerung der Selektivität bietet sich daher der Einsatz porenfreier (bzw. nahezu porenfreier) Träger an.

Figurenlegend :

- Fig. 1: Reaktive Stellen bei der tryptischen Spaltung von Präproinsulin
(INS = Insulin; A0-Arg-INS = Arg(A0)-Insulin; INS-di-Arg =
5 Arg(B31),Arg(B32)-Insulin; INS-mono-Arg = Arg(B31)-Insulin; des-Thr =
 Des(B30)-Insulin).
- Fig. 2: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der
Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Deloxan® immobilisiertem
10 Trypsin.
- Fig. 3: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der
Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C250L
immobilisiertem Trypsin.
15
- Fig. 4: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der
Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C1Z
immobilisiertem Trypsin.
- 20 Fig. 5: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der
Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C1Z
immobilisiertem Trypsin.
- 25 Fig. 6: Bedeutung der Trägermorphologie für die Selektivität der Reaktion
(S = Substrat, z.B. PPI; P = gewünschtes Zwischenprodukt, z.B. Di-Arg; Q
 = unerwünschtes Folgeprodukt, z.B. des-Thr).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist.
5
2. Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, ausgewählt aus der Gruppe der Peptide, Proteine, Oligosaccharide oder Polysaccharide, aus deren Vorstufen mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder
10 nahezu keine Poren aufweist.
3. Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial
15 keine oder nahezu keine Poren aufweist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial ein Copolymerisat aus den Monomeren Methacrylamid und N,N'-bis(methacrylamid) ist.
20
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial über oxirangruppenhaltige Monomere verfügt.
25
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit Hilfe von Oxirangruppen kovalent an das Trägermaterial gebunden ist.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym Trypsin ist.

5 8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an dem Träger immobilisierte Enzym eine Aktivität von 0,05 bis 0,5 U/ml aufweist.

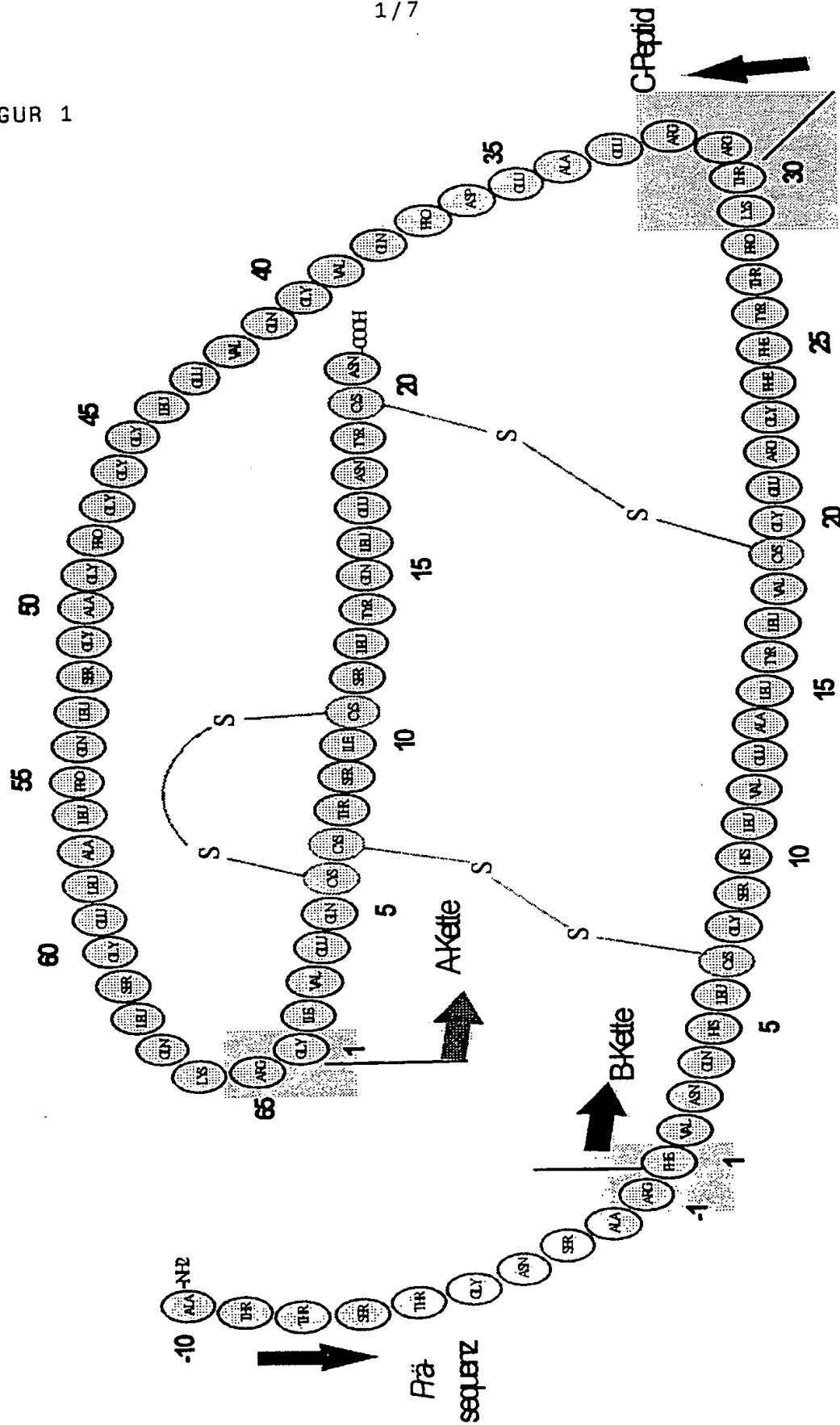
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Reaktionslösung 6 bis 10 beträgt.

10

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert 7 bis 9 beträgt.

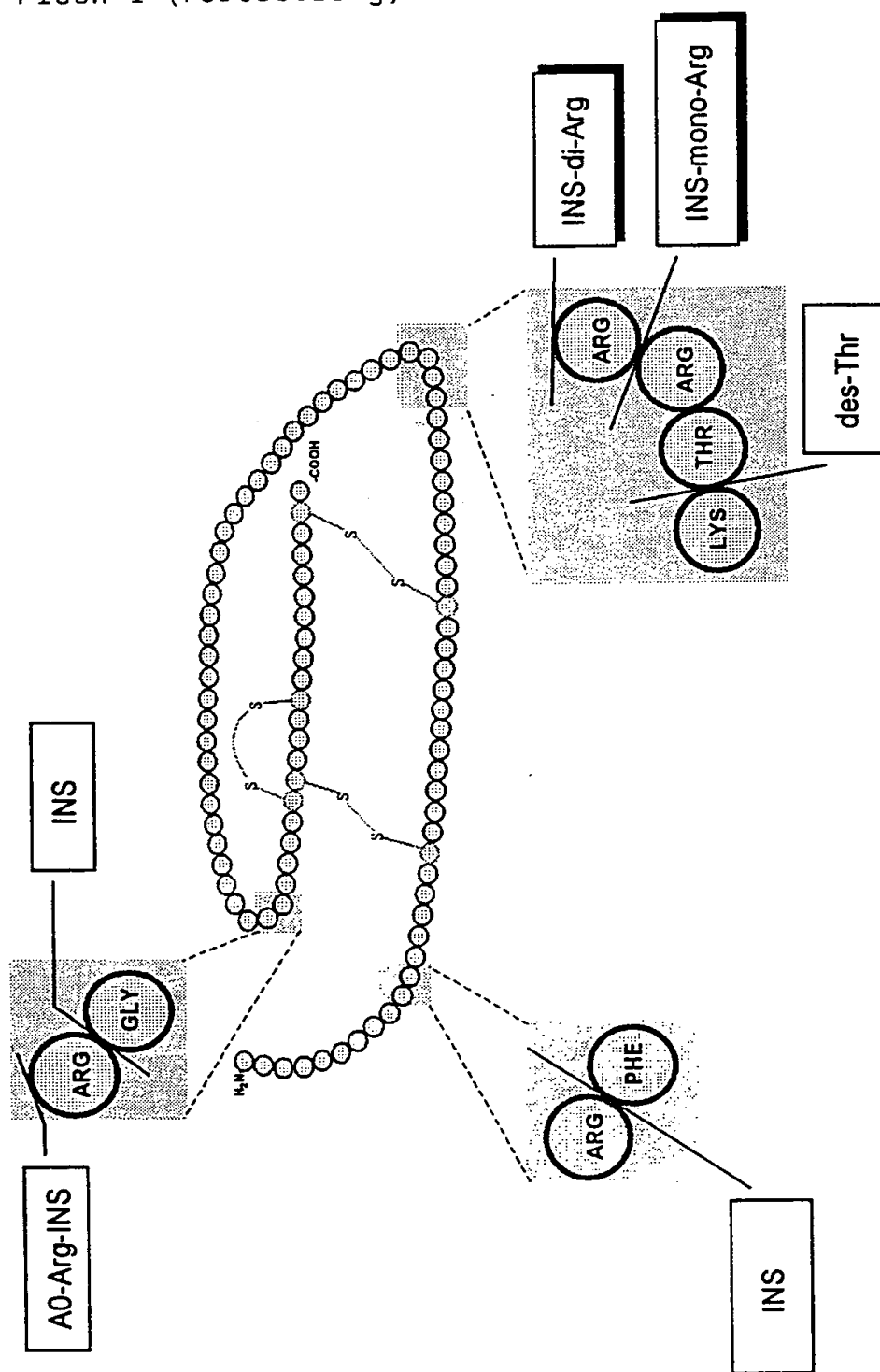
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGUR 1



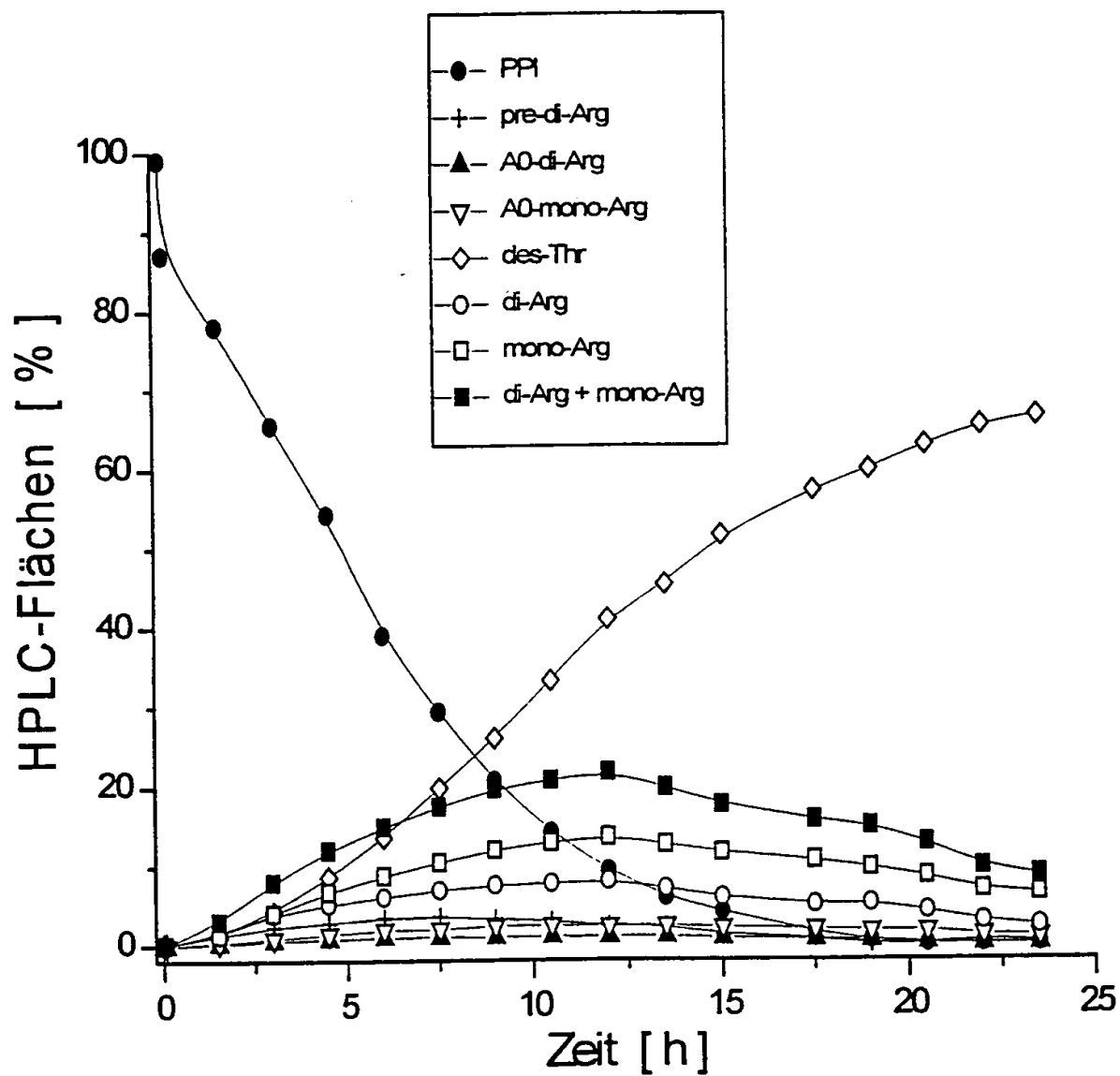
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGUR 1 (Fortsetzung)



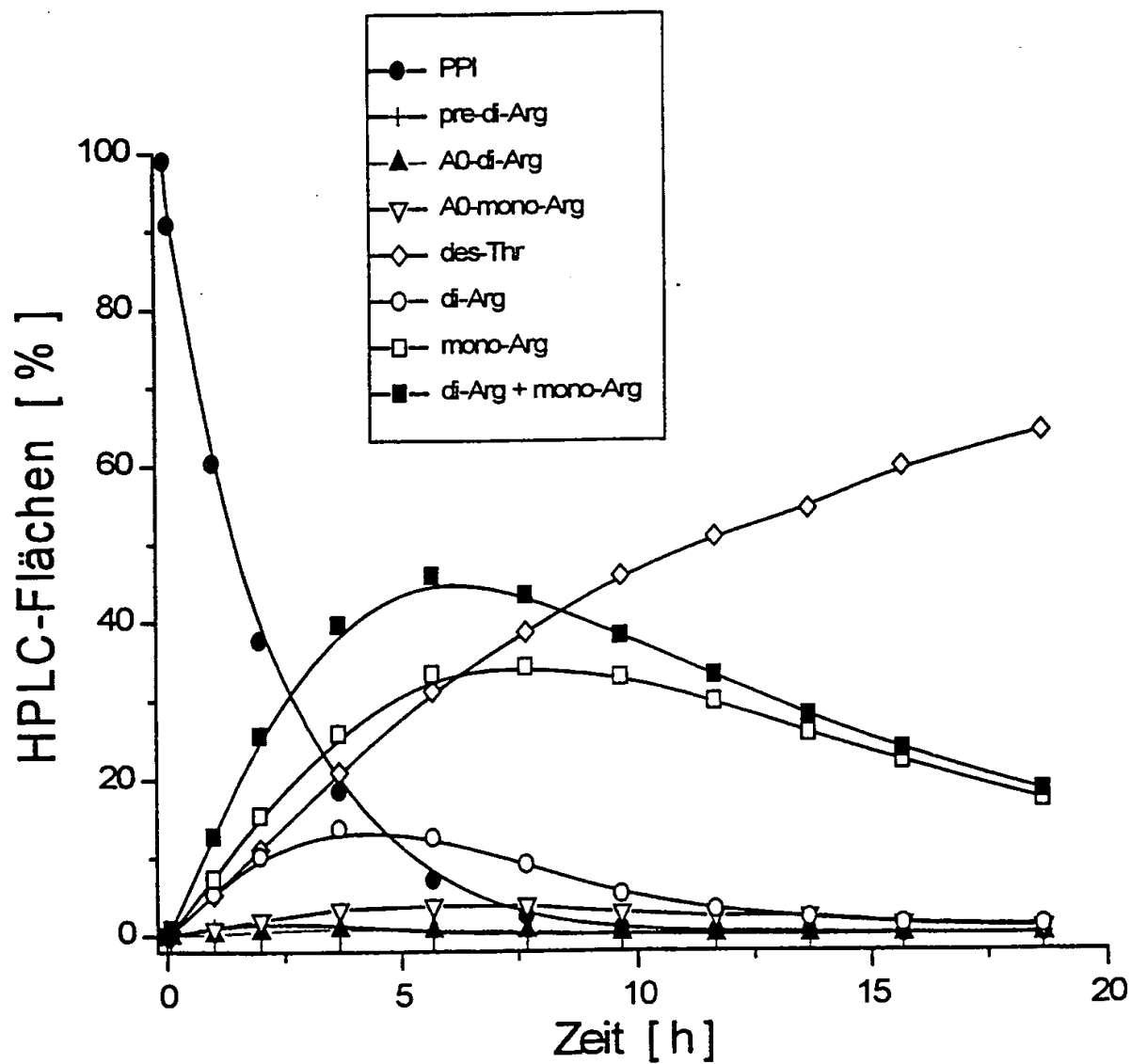
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGUR 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

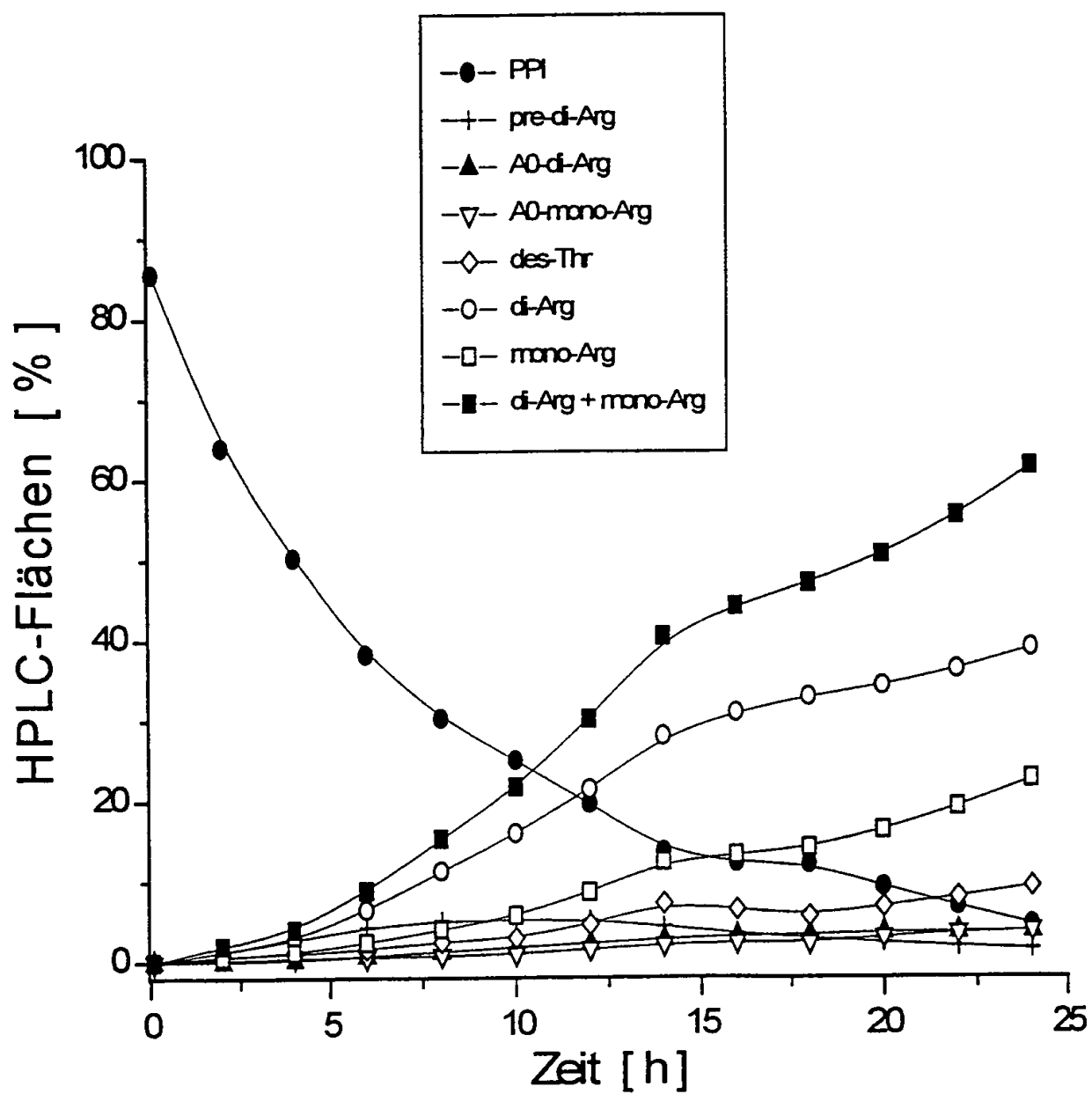
FIGUR 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

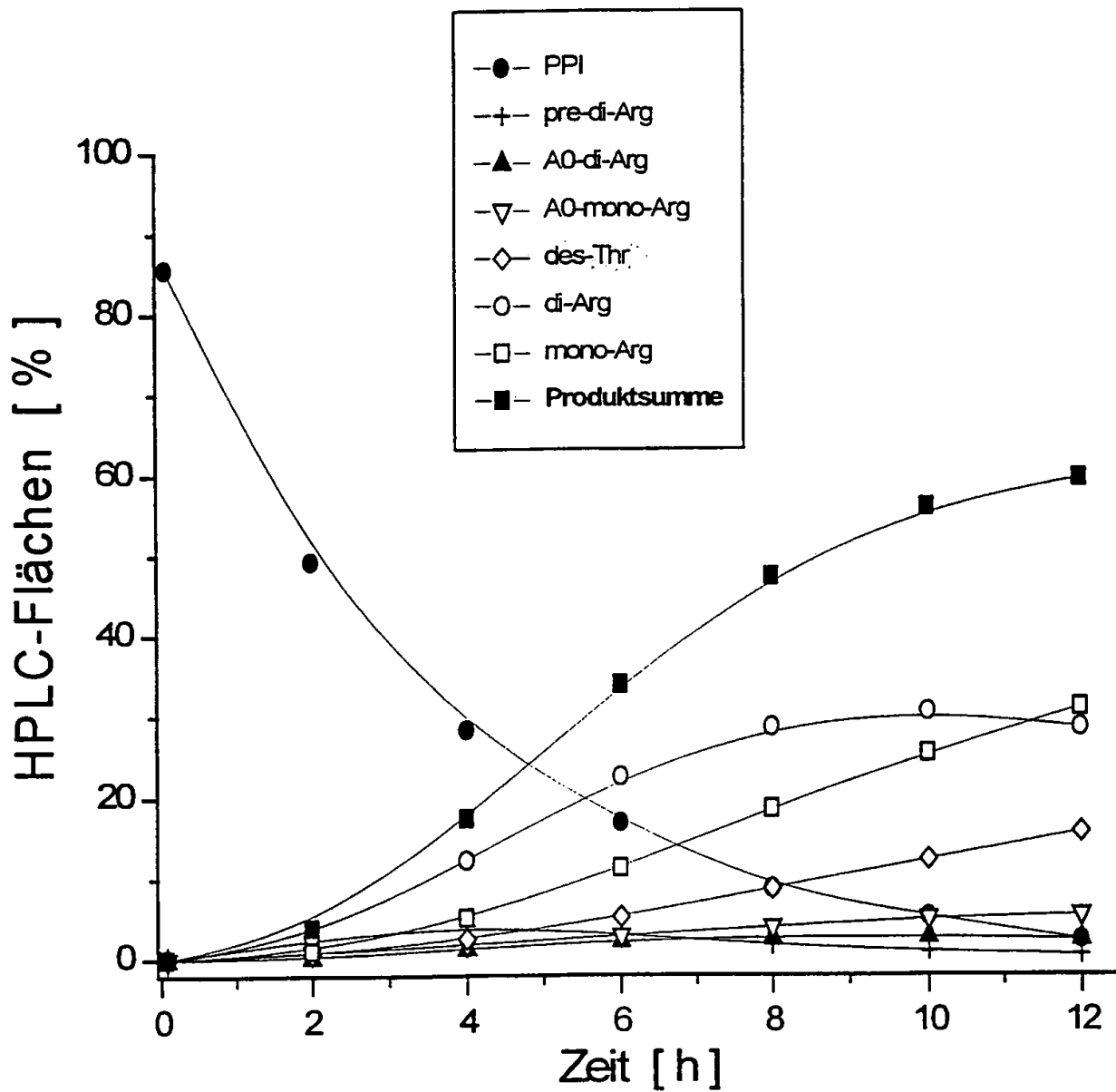
5/7

FIGUR 4



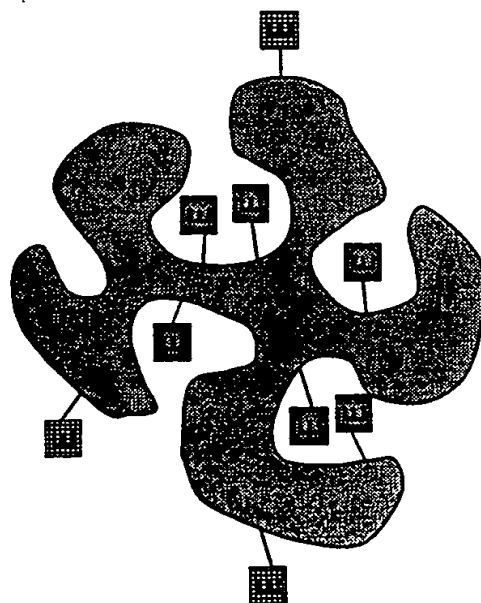
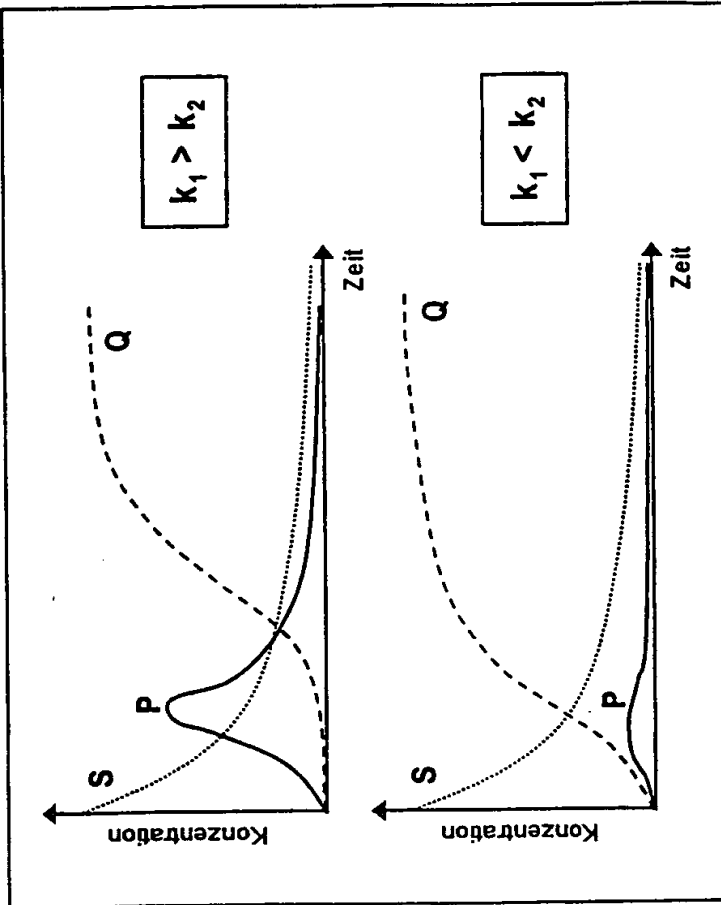
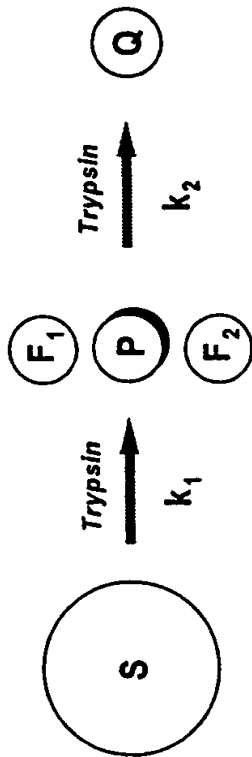
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGUR 5



THIS PAGE BLANK

FIGUR 6



poröser Träger
mit immobilisiertem Enzym

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/L029 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 02973	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/05/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/05/1998
Anmelder HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12P1/00 C12N11/00 C12P21/00 C12P19/00 C12P21/02
C07K1/04 C07K14/62 C12N11/02 C12N11/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 25, 20. Juni 1994 (1994-06-20) Columbus, Ohio, US; abstract no. 321404, HUWIG, ALEXANDER ET AL: "Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of Peniophora gigantea" XP002114237	1,2
Y	Zusammenfassung & J. BIOTECHNOL. (1994), 32(3), 309-15 , --- -/--	3-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. September 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 19, 6. November 1995 (1995-11-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 250077, LORENZEN, P. CHR. ET AL: "Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic bead for obtaining phosphopeptides from casein" XP002114238	1,2
Y	Zusammenfassung & Z. ERNÄHRUNGSWISS. (1995), 34(2), 118-30 , ---	3-10
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 7, 13. Februar 1995 (1995-02-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 82031, ECKSTEIN, H. ET AL: "Immobilization of papain and trypsin on epoxy-polymers for enzyme-catalyzed peptide synthesis" XP002114239	1,2
Y	Zusammenfassung & CHEM. PEPT. PROTEINS (1993), 5/6(PT. A), 211-16 , ---	3-10
X	US 4 994 388 A (SOLOHILL ENGINEERING, INC. AND THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 19. Februar 1991 (1991-02-19) Spalte 3 - Spalte 5 ---	1-10
Y	EP 0 294 851 A (VEB BERLIN-CHEMIE) 14. Dezember 1988 (1988-12-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	3-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Information on patent family members

PCT/EP 99/02973

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/L029 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 02973	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/05/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/05/1998
Anmelder HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12P1/00 C12N11/00 C12P21/00 C12P19/00 C12P21/02
C07K1/04 C07K14/62 C12N11/02 C12N11/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 25, 20. Juni 1994 (1994-06-20) Columbus, Ohio, US; abstract no. 321404, HUWIG, ALEXANDER ET AL: "Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of Peniophora gigantea" XP002114237	1,2
Y	Zusammenfassung & J. BIOTECHNOL. (1994), 32(3), 309-15 , --- -/--	3-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. September 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 19, 6. November 1995 (1995-11-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 250077, LORENZEN, P. CHR. ET AL: "Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic bead for obtaining phosphopeptides from casein" XP002114238	1,2
Y	Zusammenfassung & Z. ERNAHRUNGSWISS. (1995), 34(2), 118-30 , ----	3-10
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 7, 13. Februar 1995 (1995-02-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 82031, ECKSTEIN, H. ET AL: "Immobilization of papain and trypsin on epoxy-polymers for enzyme-catalyzed peptide synthesis" XP002114239	1,2
Y	Zusammenfassung & CHEM. PEPT. PROTEINS (1993), 5/6(Pt. A), 211-16 , ----	3-10
X	US 4 994 388 A (SOLOHILL ENGINEERING, INC. AND THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 19. Februar 1991 (1991-02-19) Spalte 3 - Spalte 5 ----	1-10
Y	EP 0 294 851 A (VEB BERLIN-CHEMIE) 14. Dezember 1988 (1988-12-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	3-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02973

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4994388	A	19-02-1991	NONE	
EP 0294851	A	14-12-1988	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02973

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4994388	A	19-02-1991	NONE	
EP 0294851	A	14-12-1988	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02973

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12P1/00 C12N11/00 C12P21/00 C12P19/00 C12P21/02
C07K1/04 C07K14/62 C12N11/02 C12N11/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 25, 20. Juni 1994 (1994-06-20) Columbus, Ohio, US; abstract no. 321404, HUWIG, ALEXANDER ET AL: "Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of Peniophora gigantea" XP002114237	1,2
Y	Zusammenfassung & J. BIOTECHNOL. (1994), 32(3), 309-15 , --- -/--	3-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. September 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02973

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 19, 6. November 1995 (1995-11-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 250077, LORENZEN, P. CHR. ET AL: "Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic bead for obtaining phosphopeptides from casein" XP002114238	1,2
Y	Zusammenfassung & Z. ERNÄHRUNGSWISS. (1995), 34(2), 118-30 ,	3-10
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 7 13. Februar 1995 (1995-02-16) Columbus, Ohio, US; abstract no. 82031, ECKSTEIN, H. ET AL: "Immobilization of papain and trypsin on epoxy-polymers for enzyme-catalyzed peptide synthesis" XP002114239	1,2
Y	Zusammenfassung & CHEM. PEPT. PROTEINS (1993), 5/6(PT. A), 211-16 ,	3-10
X	US 4 994 388 A (SOLOHILL ENGINEERING, INC. AND THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 19. Februar 1991 (1991-02-19) Spalte 3 - Spalte 5	1-10
Y	EP 0 294 851 A (VEB BERLIN-CHEMIE) 14. Dezember 1988 (1988-12-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	3-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02973

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4994388	A	19-02-1991	KEINE	
EP 0294851	A	14-12-1988	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 03 AUG 2000
WIPO PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/L029 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/02973	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/05/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/05/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P1/00		
Anmelder AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/12/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 31.07.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Douschan, K Tel. Nr. +49 89 2399 8702 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/02973

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-9 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	4-6
	Nein: Ansprüche	1-3,7-10
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1). Die folgenden Dokumente werden zitiert:

- D1: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 25, 20. Juni 1994 (1994-06-20)
Columbus, Ohio, US; abstract no. 321404, HUWIG, ALEXANDER ET AL:
'Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea*' XP002114237 & J. BIOTECHNOL. (1994), 32(3), 309-15 ,
- D2: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 19, 6. November 1995 (1995-11-06)
Columbus, Ohio, US; abstract no. 250077, LORENZEN, P. CHR. ET AL:
'Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic bead for obtaining phosphopeptides from casein' XP002114238 & Z. ERNÄHRUNGSWISS. (1995), 34(2), 118-30 ,
- D3: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 7, 13. Februar 1995 (1995-02-13)
Columbus, Ohio, US; abstract no. 82031, ECKSTEIN, H. ET AL:
'Immobilization of papain and trypsin on epoxy-polymers for enzyme-catalyzed peptide synthesis' XP002114239 & CHEM. PEPT. PROTEINS (1993), 5/6(Pt. A), 211-16 ,
- D4: US-A-4 994 388 (SOLOHILL ENGINEERING, INC. AND THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 19. Februar 1991 (1991-02-19)
- D5: EP-A-0 294 851 (VEB BERLIN-CHEMIE) 14. Dezember 1988 (1988-12-14)
(in der Anmeldung erwähnt),
- D6: Angewandte Chemie, Jahrgang 97, Heft 2, 1985, S. 79-87 (in der Beschreibung erwähnt).

Dokumente D1-D3 sind Zusammenfassungen, die auf Artikeln in wissenschaftlichen Zeitschriften basieren; im weiteren Verfahren werden die wissenschaftlichen Artikel unter denselben Abkürzungen wie die der Zusammenfassungen zitiert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2.) Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Art. 33(1)-(3) PCT):

Ansprüche 1 und 2:

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft gemäß Definition in den besagten Ansprüchen ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, wobei dieser Träger entweder keine oder "nahezu" keine Poren aufweist.

Dokumente D1-D3 offenbaren die Synthese großer Moleküle mittels an polymere Träger mit "nahezu" keinen Poren gebundener Enzyme, sodaß diese Dokumente die Neuheit von Ansprüchen 1 und 2 zerstören. Für diese Ansprüche kann daher auch keine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

Ansprüche 3 und 7-10:

Wie bereits oben erwähnt, ist der Einsatz von immobilisierten Enzymen in der Peptidsynthese (siehe Dokumente D2 und D3) bereits bekannt.

D4 beschreibt in Spalte 5 (Zeilen 10ff) die Vorteile von Trägermaterial ohne Poren bei der Verwendung von biologischen Verfahren.

D5 und D6 beschreiben, entgegen der von der Anmelderin auf S. 2 Zeile 5ff gemachten Aussage, die Verwendung von immobilisiertem Trypsin bei der Insulinsynthese. Da der Ausdruck "nahezu keine Poren" undefiniert ist, ist die Neuheit der Ansprüche 3 und 7-10 (sofern sie sich auf Anspruch 3 beziehen) im Hinblick auf die Dokumente D5 und D6 nicht gegeben. Für diese Ansprüche kann somit weder Neuheit noch erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

Ansprüche 4-6:

Im Lichte des vorliegenden Standes der Technik scheinen diese Ansprüche neu zu sein.

Nichtsdestotrotz, im Hinblick auf die Dokumente D4 und D5 kann keine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden. D5 beschreibt den Einsatz von immobilisiertem Trypsin bei der Insulinsynthese, und D4 legt die Verwendung von porenfreiem Trägermaterial nahe.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Eine erfinderische Tätigkeit könnte allenfalls für die in der Beschreibung (siehe Beispiele 1-5) gezeigte vorteilhafte Anwendung von Eupergit[®] C1Z anerkannt werden, die als Anzeichen für das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit gesehen werden könnte. Warenzeichen in den Ansprüchen sollen jedoch vermieden werden, da sie diese unklar gestalten.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Angewandte Chemie, Jahrgang 97, Heft 2, 1985, S. 79-87

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D4 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Ausdrücke "groß", "komplex" und "nahezu" in den Ansprüchen 1, 2, bzw. 3 haben keine definierte Bedeutung und gestalten das Anspruchsbegehren daher unklar (Art. 6 PCT).
2. Ebenso ist der Ausdruck "Vorstufen" in Anspruch 2 und der Ausdruck "Analoge" in Anspruch 3 unklar, da nicht ersichtlich ist, was damit gemeint ist.
3. In Anspruch 3 soll entweder der Ausdruck "Enzym" oder der Begriff "Vorläufer" oder beide Begriffe eingeschränkt werden, da der Anspruch aus zu vielen Variablen besteht und insofern unklar ist, als man nicht erkennen kann, was woraus und womit hergestellt wird (Art. 6 PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Wie bereits unter Abschnitt V.2 erwähnt, sind die Ansprüche 1 und 2 viel zu breit, vage und undefiniert (Art. 6 PCT).
5. Der Ausdruck "Trägermaterial" in den Ansprüchen soll ebenfalls spezifiziert werden, wobei anhand der Beschreibung klar ist, daß nur ein einziges spezifisches Trägermaterial Verwendung findet bzw. die Aufgabe löst (siehe Beispiele: Eupergit[®] C1Z) - Art. 6 und 5 PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation
09/700391

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1998/L029 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/02973	International filing date (day/month/year) 03 May 1999 (03.05.99)	Priority date (day/month/year) 15 May 1998 (15.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 1/00, C12N 11/00, C12P 21/00, 19/00, 21/02, C07K 1/04, 14/62, C12N 11/02, 11/06		
Applicant AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH		MAR 12 2001

RECEIVED

TECH CENTER 1600/2900

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 December 1999 (09.12.99)	Date of completion of this report 31 July 2000 (31.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/02973

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-9, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-10, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/02973

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.
Patent No.

Publication date
(day/month/year)

Filing date
(day/month/year)

Priority date (valid claim)
(day/month/year)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure
(day/month/year)

Date of written disclosure
referring to non-written disclosure
(day/month/year)

See supplemental box.

BE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/02973

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-6	YES
	Claims	1-3, 7-10	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report cites the following documents:

- D1: CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 120, No. 25, 20 June 1994 (1994-06-20), Columbus, Ohio, US; abstract no. 321404, HUWIG, ALEXANDER ET AL.: 'Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of Peniophora gigantea', XP002114237 & J. BIOTECHNOL. (1994), 32(3), 309-15
- D2: CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 123, No. 19, 6 November 1995 (1995-11-06), Columbus, Ohio, US; abstract no. 25077, LORENZEN, P. CHR. ET AL.: 'Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic bead for obtaining phosphopeptides from casein', XP002114238 & Z. ERNAERUNGSWISS. (1995), 34(2), 118-30
- D3: CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 122, No. 7, 13 February 1995 (1995-02-13), Columbus, Ohio, US; abstract no. 82031, ECKSTEIN, H. ET AL.: 'Immobilization of papain and trypsin on epoxy-polymers for enzyme-catalyzed peptide synthesis', XP002114239 & CHEM. PEPT. PROTEINS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1993), 5/6 (PT. A), 211-16

D4: US-A-4 994 388 (SOLOHILL ENGINEERING, INC. AND THE UNIVERSITY OF MICHIGAN), 19 February 1991 (1991-02-19)

D5: EP-A-0 294 851 (VEB BERLIN-CHEMIE), 14 December 1988 (1988-12-14) (mentioned in the application)

D6: *Angewandte Chemie, Jahrgang 97, Issue 2, 1985, pages 79-87* (mentioned in the description).

D1-D3 are abstracts based on articles in scientific magazines; in further proceedings, the same numbering will apply to the scientific articles and their abstracts.

2. **Novelty and inventive step (PCT Article 33(1)-(3))**

Claims 1 and 2:

As defined in these claims, the present application concerns a method for catalysing complex reactions of large molecules using enzymes bonded to a polymer substrate which has no or "almost" no pores.

D1-D3 disclose the synthesis of large molecules using enzymes bonded to polymer substrates having "almost" no pores, and therefore these documents deprive Claims 1 and 2 of novelty. Consequently, no inventive step can be acknowledged in these claims.

Claims 3 and 7-10:

As already mentioned above, the use of immobilised enzymes for synthesising peptides is already known (see D2 and D3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

D4 describes in column 5 (lines 10 ff.) the advantages of poreless substrate materials when applying biological methods.

Contrary to the applicant's statement on page 2, lines 5 ff., D5 and D6 describe the use of immobilised trypsin for insulin synthesis. Since the expression "almost no pores" is undefined, the novelty of Claims 3 and 7-10 (insofar as these refer to Claim 3) is not established over D5 and D6. Consequently, neither novelty nor an inventive step can be acknowledged in these claims.

Claims 4-6:

In the light of the available prior art, these claims appear to be novel.

Notwithstanding this novelty, an inventive step cannot be acknowledged in the light of D4 and D5. D5 describes the use of immobilised trypsin for insulin synthesis, and D4 suggests the use of poreless substrate material.

At best, an inventive step could be acknowledged in the advantageous use of Eupergit^R C12 shown in the description (see Examples 1-5), which could be regarded as a sign of inventive step. However, trademarks should be avoided in the claims, since they make the claims unclear.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02973

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX VI

*Angewandte Chemie, Jahrgang 97, Issue 2, 1985, pages
79-87*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02973

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite documents D1-D4 and does not indicate the relevant prior art disclosed therein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The terms "large", "complex" and "almost" in Claims 1, 2 and 3 do not have a defined meaning and make the claims unclear (PCT Article 6).
2. Likewise, the term "pre-stages" in Claim 2 and the term "analogues" in Claim 3 are not clear because it is not possible to understand what they mean.
3. In Claim 3, the term "enzyme" and/or the term "precursor" should be restricted because the claim includes too many variables and is unclear, since it is not possible to recognise what is produced from what and using what (PCT Article 6).
4. As already mentioned in Box V, point 2, Claims 1 and 2 are too broad, vague and undefined (PCT Article 6).
5. The term "substrate material" in the claims should likewise be specified. It is clear from the description that only one specific substrate material is used and solves the problem (see the examples: Eupergit^R C12) (PCT Articles 6 and 5).

THIS PAGE BLANK (USPTO)